

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-231558

⑬ Int. Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)9月13日

G 01 N 27/327

7363-2G
7363-2G

G 01 N 27/30

3 5 3 J
R

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全5頁)

⑮ 発明の名称 酵素センサ

⑯ 特 願 平1-51291

⑰ 出 願 平1(1989)3月3日

⑱ 発 明 者 小 山 昇 東京都府中市新町3丁目5番地の24
⑲ 出 願 人 テ ル モ 株 式 会 社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号
⑳ 出 願 人 小 山 昇 東京都府中市新町3丁目5番地の24
㉑ 代 理 人 弁 理 士 朝 倉 勝 三

明 細 書

1. 発明の名称

酵 素 セ ン サ

2. 特許請求の範囲

(1) 導電性基体と、該導電性基体の少なくとも一部を被覆するとともに、電子移動媒体および2価の鉄イオンを含む化合物を有するとともに過酸化水素の還元反応を行う還元機能層と、該還元機能層の少なくとも一部を被覆する酵素固定化層とを備えたことを特徴とする酵素センサ。

(2) 前記電子移動媒体は、構造式が、

[M L_m Y_n] (ただし、式中Mは遷移金属イオン、LおよびYは該遷移金属イオンに配位する化合物を示し、mとnは配位数を示す。)である請求項1記載の酵素センサ。

(3) 前記電子移動媒体は、構造式が、

[Ru(NH₃)₆]²⁺または[Ru(NH₃)₅X]²⁺ (ただし、Xはピリジン、ハロゲンイオン、ニコチンアミドまたは結晶水を表わす。)である請求項2記載の酵素センサ。

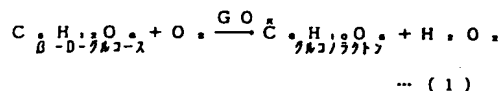
3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は酵素電極を用いて電流法(アンペロメトリック法)により基質濃度を測定する酵素センサに関し、特に粘土(モンモリロナイト)の薄膜中に構造的に取り込まれている2価の鉄イオンの還元触媒作用を利用した酵素センサに関する。

[従来の技術]

酵素センサは、主に臨床化学分析に用いられ、測定対象としてグルコース(ブドウ糖)、尿素、中性およびリン脂質等に対するものが実用化されている。例えば、測定対象がグルコースの場合の酵素反応は次式により表わされる。



すなわち、β-D-グルコースは、β-D-グルコースオキシダーゼ(GO)の作用により、酸素(O₂)を消費して有機酸(グルコノラクトン)と過酸化水素(H₂O₂)を生成する。

したがって、過酸化水素やグルコノラクトンの発生量、あるいは酸素消費量よりグルコース濃度を測定できるものである。

ところで、従来、過酸化水素の発生量により、グルコース濃度を測定する場合には、生成した過酸化水素を金属電極で酸化し、その酸化電流を測定したり、あるいは還元して還元電流を測定したりする方法が用いられている。しかし、これらの酸化還元電流は、酸素の影響を受けたり、また従来の検出電極では、その表面状態の変化の影響を受けやすい。また、電気化学的手法による測定原理では、電極基体/液/酵素固定膜/被検出液から成るセンサ構成であり、電極と膜との間に存在する液によりセンサの微小化が困難である。

さらに、従来、他の測定方法として、

- (1) カタラーゼにより過酸化水素を酸素と水に分解し、その酸素の量を測定するか、
- (2) 酵素（ペルオキシダーゼ）や無機触媒（モリブデン）等の存在下でヨウ化物イオンを酸化し、次の反応を行わせることによりヨウ素の量を

あって、グルコース等の基質濃度を簡易かつ短時間に測定することができるとともに、汚染のおそれもなく、かつ微小化も実現可能な酵素センサを提供することを目的とする。

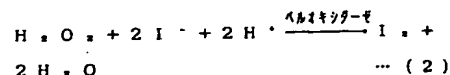
〔課題を解決するための手段〕

上記従来の課題を解決するために、本発明に係る酵素センサは、導電性基体と、該導電性基体の少なくとも一部を被覆するとともに、電子移動媒体および2価の鉄イオンを含む化合物を有するとともに過酸化水素の還元反応を行う還元機能層と、該還元機能層の少なくとも一部を被覆する酵素固定化層とを備えたことを特徴とする。

前記電子移動媒体としては、構造式が、 $[ML_nY_m]$ （ただし、式中Mは遷移金属イオン、LおよびYは該遷移金属イオンに配位する化合物を示し、mとnは配位数を示す。）であり、具体的には $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ または $[Ru(NH_3)_5X]$ （ただし、Xはピリジン、ハロゲンイオン、ニコチンアミドまたは結晶水を表わす。）で示されるものが用いられる。

特開平2-231558 (2)

測定し、これにより間接的に過酸化水素の量を測定する方法がある。



〔発明が解決しようとする課題〕

上述のように従来、過酸化水素の発生量によりグルコース濃度を測定する場合には、酸素の消費量またはヨウ素の発生量を測定し、その量により間接的に過酸化水素の発生量を得ていた。

しかしながら、このように2段階の反応により測定する方法では、グルコース等を過酸化水素に分解するための酵素電極の他に酸素またはヨウ素を測定するための電極が別途必要であり、測定が極めて煩雑であるとともに測定時間が長くなるという問題があった。一方、従来の電気化学的方法では、前述のようにセンサが内部液を含むため、測定液の汚染や微小化が困難であるという問題があった。

本発明はかかる問題点に鑑みてなされたもので

〔作用〕

すなわち、本発明の酵素センサは、還元機能層内の電子移動による還元触媒反応を利用するもので、例えば第1図にその構造を示すような粘土（ナトリウム塩モンモリロナイト）に含まれるナトリウム塩と、電子移動媒体としての $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ 錯体とを交換置換させ、この $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ を見かけ上粘土層中に固定化し、この上に酵素固定化層を被覆した複合構造を有している。したがって、例えばグルコース液に接触させると、このとき前述の(1)式で示したようにグルコースの酸化反応により生成される過酸化水素が、粘土層中に構造的に取り込まれている鉄イオンの2価により水まで還元され、これにより導電性基体中に還元電流が生じる。この電流値は、グルコースの濃度と比例関係にあり、したがって当該電流値を測定することにより、グルコースの濃度を測定することができる。なお、第1図(a)(b)中において、○は酸素、●は水素、●はアルミニウムまたはマグネシウム、

。および・はシリコンまたはアルミニウムの原子をそれぞれ示している。

第1図は上記酵素固定化層におけるグルコースの酸化反応と、還元機能層中の $[Ru(NH_3)_6]^{2+}$ 錯体と2価の鉄イオンの還元触媒反応とによるグルコース濃度の測定原理の概略を示すものである。

なお、酵素濃度の測定には電流（アンペロメトリック）法が用いられるもので、 $[Ru(NH_3)_6]^{2+}$ 錯体の構造式中のXを変えることにより過酸化水素の還元電流値を変えることが可能である。

【実施例】

以下、本発明の実施例を図面を参照して具体的に説明する。

（実施例1）

導電性カーボン（UCC社製、BPG）を、直径約1mmの円筒状に切削し、その一方の端面を銀ペーストで銅線（リード線）と接合させ、またこのカーボン筒の側面を熱収縮チューブ

a) 4mg/ml グルコースオキシダーゼ (GOx)
+ 15% 牛血清アルブミンと 50mM リン酸緩衝液 (pH=7.00) 1.0μl

b) 25重量% グルタルアルデヒド溶液 1.2μl

次いで、 5×10^{-3} M の $[Ru(NH_3)_6]^{2+}$ 錯体を含む0.1M リン酸緩衝液 (pH=7.00) 溶液中に15分間浸した後、未反応のグルコースオキシダーゼを取り除くために、10重量% グリシン溶液中に2分間浸した。

実験例1

グルコース濃度を測定するための実験を行った。すなわち、 1.6×10^{-3} M の $[Ru(NH_3)_6]^{2+}$ 錯体を含む0.1M リン酸緩衝液 (pH=7.00) の混合溶液をセル（容積25μl）の中に入れ、この中の溶液を窒素ガスで十分置換させた。作用極、対極（白金網）、基準極（飽和塩化ナトリウムカロメロ電極：SSCE）から成る三電極セルを用いて、定電位電流法によりグルコース濃度の測定を行った。

特開平2-231558 (3)

（ペンジエクト社製テフロンチューブ、登録商標PENNTUBENTH）で固定し、隙間に絶縁性エポキシ樹脂（スリーボンド社製、TB2067）を充填し熱固化させて、カーボン電極を作成した。

次いで、このカーボン電極を粘土（モンモリロナイト）溶液（濃度0.5重量%）により約1μm 膜厚で被覆した。そして、やや乾燥させた後（完全乾燥ではひびが発生する）、この電極を0.2mM の $[Ru(NH_3)_6]^{2+}$ 錯体を含む0.1M リン酸緩衝液 (pH=7.00) の混合溶液中に浸し、溶液を窒素雰囲気にしてから、+0.2~-0.6V（対飽和塩化ナトリウムカロメロ電極：SSCE）の範囲で掃引させ、粘土中に $[Ru(NH_3)_6]^{2+}$ 錯体を取り込ませた（5分間）。

次に、当該カーボン電極を乾燥させた後、マイクロシリンジにて酵素溶液を電極上に滴下し、均一にこれら溶液を引き伸ばし、架橋反応を行わせて酵素を固定化した。

なお、酵素溶液は次の通りとした。

この場合、一定電位（-0.18V 対SSCE）条件下において、還元電流値（95%以上のほぼ飽和還元電流値）を測定する方法で行った。

実験例2

実施例1において作製した導電性カーボン／粘土層（膜厚1μm）／酵素固定化膜（膜厚0.3μm）からなる酵素センサを実験例1で述べた三電極構成を組んで、サイクリックボルタンメトリーを行った。

実験には、測定液として、 1.16×10^{-3} M $[Ru(NH_3)_6]^{2+}$ 錯体を含むリン酸緩衝液 (pH=7.00) の混合溶液を用い、印加電圧は掃引速度200mV/秒で、-0.6~-0.2V（対SSCE）の間で掃引させた。このときのサイクリックボルタモグラムを第3図に示す。波形および酸化ピーク電位：-0.2V（対SSCE）と還元ピーク電位：-0.27V（対SSCE）の値から、この錯体の酸化還元反応が可逆的であることを示している。

次に、この測定系に、グルコースを加し、

特開平2-231558 (4)

グルコースオキシダーゼの働きにより生成する過酸化水素を電極被覆層である粘土の表面で還元させ、このときの還元電流値を求めた（但し、電位は -0.18 V （対SSCE）で一定）。測定は酸素雰囲気下で行った。

グルコース濃度（ $2\sim 80\text{ mg/dl}$ ）変化に対応する電流値変化を第4図（a）、（b）に示す。また、このときのグルコース濃度と電流値の関係を第5図に示す。第5図中、○は第4図（a）、●は第4図（b）にそれぞれ対応し、また□は空気雰囲気中で測定したものを示すものである。

測定結果によれば、酸素雰囲気下では、グルコース濃度が 50 mg/dl 付近までは、その濃度と還元電流値とはほぼ直線性を示している。一方、空気雰囲気下で測定した場合、グルコース濃度は約 20 mg/dl 以上では電流値が飽和に到達することが明らかとなった。

なお、一定電位値を -0.27 V （対SSCE）として還元電流値を測定すると、還元電流値が時間に対して減少する方向に表示された。

図ることもできる。さらに、酵素固定化膜の形成に電解反応法、ディッピング法、スピンコート法等が適用できるので、電極基板の大きさが微小であっても膜被覆が可能であり、その上固体電極構成であり、従来のような内部液室等が不要であるため、測定液の汚染のような問題がない。また、超微小電極の作製も可能となり、特に医療分野のセンサとしてその利用度が極めて高くなるという効果を奏する。

4. 図面の簡単な説明

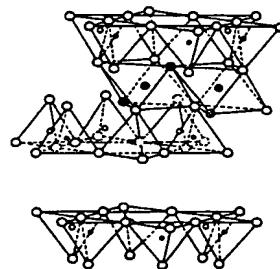
第1図は本発明の実施例に係る酵素センサに適用されるモンモリロナイトの構造図、第2図は本発明の基本原理を示す概略構成図、第3図は本発明の実施例に係る酵素電極のサイクリックボルタモグラムの示す図、第4図は同じくグルコース濃度に対応する電流値の変化を示す図、第5図は第4図の特性値に基づいてグルコース濃度と電流値との関係を示す図である。

したがって、本実験では、還元電流値がグルコースの分解反応に比例して生成する、過酸化水素の還元電流に匹敵する電位として、 -0.18 V （対SSCE）を選んだ。

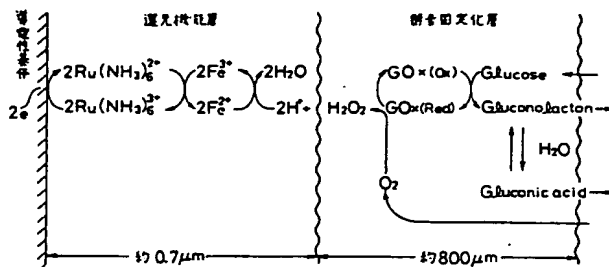
以上のことから、グルコースオキシダーゼの酵素反応により生成した過酸化水素を $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ 錯体を取り込んだ粘土（ナトリウム塩モンモリロナイト）で還元させることにより、グルコースを定量できることが明らかになった。

〔発明の効果〕

以上説明したように本発明に係る酵素センサによれば、電子移動媒体および2価の鉄イオンを含む化合物を有する還元機能層と、該還元機能層を被覆する酵素固定化膜との2層の固体膜構造とし、酵素固定化膜においてグルコース等を分解して生成する過酸化水素を、還元機能層中の電子移動媒体および2価の鉄イオンにより還元させるようにしたので、構造が簡素化されるとともに、測定が極めて容易となり、また測定時間の短縮化を

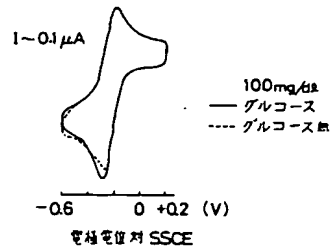


第1図

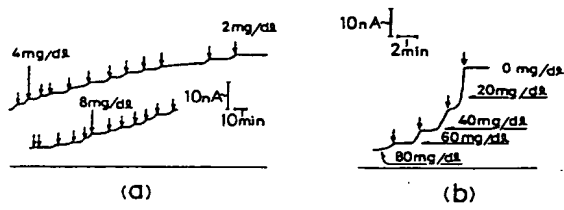


第2図

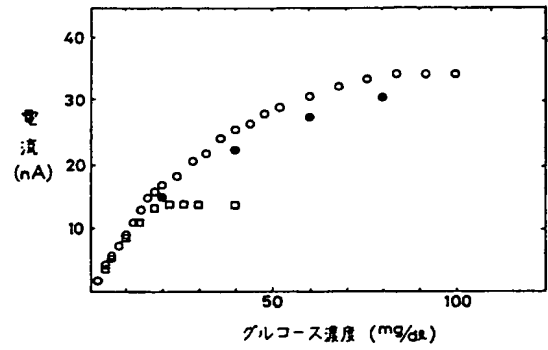
特開平2-231558 (5)



第 3 図



第 4 図



第 5 図